

**EFEITO DO ENVELHECIMENTO E DO TREINAMENTO DE FORÇA NO
REMODELAMENTO DE FÊMURES DE RATOS**

GONÇALO CARREIRO DE FARIAS JUNIOR

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação
Faculdade de Ceilândia
Universidade de Brasília**

**EFEITO DO ENVELHECIMENTO E DO TREINAMENTO DE FORÇA NO
REMODELAMENTO DE FÊMURES DE RATOS**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências da Reabilitação da
Universidade de Brasília, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.**

Brasília, 2017

AGRADECIMENTOS

À minha família;

Agradeço o esforço em criar oportunidades na minha vida, com seus exemplos de dedicação e empenho ao buscar a transformação de sonhos em realidade. Obrigado por acreditarem no meu potencial.

Ao meu marido;

Pelo amor e compreensão durante um dos períodos de maior reflexão e aprendizado da minha vida. Obrigado pela resiliência em suportar meu mal humor, e por entender os momentos que não pude estar presente.

À minha orientadora;

Profa. Rita de Cássia Marqueti Durigan, por ser um exemplo de profissional empenhada e capaz de tudo. Obrigado por ter sido presente em todas as etapas do processo, pelo tempo dedicado a mim, pela paciência em me ensinar e pela amizade. Tenho orgulho de ser seu aluno.

Aos mestres;

Prof. João Luiz Quagliotti Durigan, por ter acreditado em mim no início desse processo e me dado a oportunidade de crescer profissionalmente.

Profa. Carine Royer, pela participação no meu aprendizado em laboratório, e pelas colocações que enriqueceram o estudo.

Professores das disciplinas do PPGCR, por compartilharem o conhecimento científico e me darem a chance de prosperar no ambiente acadêmico.

Aos amigos;

Graziéle Deriggi Pisani, por ter sido minha tutora no primeiro contato com laboratório, pelo tempo dedicado aos experimentos e pelos sorrisos acolhedores, sempre demonstrando que ama o que faz.

Ivo Neto, por ter sido meu parceiro em momentos de incerteza, por acreditar no nosso trabalho e pela amizade que criamos.

Joana, Karenina, Karina e Márcia, pelos momentos de alegria e medo compartilhados, e pelo apoio sempre.

Aos amigos de longa data, pela amizade e presença durante todo o processo, e principalmente por me apoiarem quando parecia muito difícil continuar.

Ao Dr. Cícero Nunes, pela disponibilidade em me ouvir, independente do horário, e pelas sugestões em como melhorar minha abordagem com o processo do mestrado.

Ao grupo de pesquisa GPlast;

Por terem me recebido de braços abertos, e compartilharem comigo o conhecimento e a capacidade de alcançarmos nosso melhor potencial.

Aos pesquisadores;

Do Farmol, por ceder o espaço para condução dos experimentos, pela ajuda nos momentos de dúvidas em protocolos, e pelo ambiente de trabalho receptivo e agradável. Agradecimentos especiais a Carol Lourenço, Cinthia, Henrique, Ana Carolina, Anna Paula e Rilva pelo auxílio e paciência ao me ajudarem, e ao Prof. Francisco pela cordialidade ao permitir meu acesso ao laboratório.

Do LBBM/UFSCar, pelo acolhimento durante as semanas que frequentei o laboratório e pela generosidade em me ajudar quando não tinha conhecimento nenhum dos processos laboratoriais.

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação gráfica do processo de remodelamento ósseo (adaptada de BARON & KNEISSEL, 2013).

Figura 2 – Análise da expressão gênica de a) COL-1, b) SOST, c) MEPE, d) PPAR γ , e) MMP-2, f) MMP-9, g) MMP-13 e h) TIMP-1 nos fêmures esquerdos dos animais dos grupos experimentais.

Figura 3 - a) Densitometria do colágeno tipo I nos grupos experimentais, normalizada pela β -actina, b) Representação gráfica do conteúdo proteico do colágeno tipo I em unidade arbitrária (UA) em fêmures.

Figura 4 - a) Densitometria da atividade da MMP-2 total = MMP-2 Pro (~72 kDa) e MMP-2 ativa (~62 kDa) em fêmures. b) Representação gráfica da atividade total da MMP-2 (MMP-2 pro + MMP-2 ativa) em fêmures.

Lista de Tabelas

TABELA I – Relação de proteínas que serão analisadas no presente estudo e os dados encontrados na literatura sobre sua expressão no exercício resistido e no envelhecimento.

TABELA II – Descrição da sequência de primers utilizados no estudo.

Lista de Abreviaturas

BMPs – proteínas morfogênicas do osso

BMU – Unidade multicelular básica

COL-1 – Colágeno Tipo I

DMO – Densidade mineral óssea

DP – Desvio padrão

LRP5/6 – Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5/6

M-CSF – fator estimulante da colônia de macrófagos

MEC – Matriz extracelular

MEPE – proteína fosforilada da matriz extracelular

MMP-13 – Metaloproteinase 13

MMP-2 – Metaloproteinase 2

MMP-9 – Metaloproteinase 9

MMPs – Metaloproteinases de matriz

mRNA – RNA mensageiro

MSC – Células tronco mesenquimais

OPG – osteoprotegerina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PPAR γ – receptores ativados por proliferador de peroxissoma

PVDF - fluoreto de polivinilideno

qPCR – reação em cadeia de polimerase quantitativa

RANKL – ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa-B

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPS18 – proteína ribossomal s18

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SOST – Esclerostina

TF – Treinamento de força

TIMP-1 – Inibidor tecidual de metaloproteinase 1

β -actina – Beta actina

β -catenina – Beta catenina

Resumo

O osso é um tecido dinâmico capaz de absorver impactos e, como outros tecidos, sofre os efeitos do envelhecimento. As propriedades da matriz extracelular ficam fragilizadas, levando a maior risco de fraturas em idosos. Exercícios físicos, como o treinamento de força, são bem estabelecidos como atenuadores desses efeitos deletérios, logo, nesse contexto, faz-se necessário estudos biomoleculares que expliquem tais benefícios no remodelamento ósseo. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do envelhecimento, bem como o efeito do treinamento de força sobre as propriedades da MEC, relacionados ao remodelamento ósseo em ratos. **Materiais e métodos:** foram utilizados 20 ratos *Wistar Novergicus Albinos*, de 3 e 20 meses, divididos em quatro grupos experimentais com 5 animais cada Jovens Sedentários (JS), Velhos Sedentários (VS), Jovens Treinados (JT) e Velhos Treinados (IT). O treinamento de força (TF) de 12 semanas foi realizado uma vez a cada dois dias. Primeiramente, os ratos foram adaptados ao protocolo de TF para escalarem uma escada vertical, com pesos presos as suas caudas, realizando de 8 a 12 movimentos por escalada. As sessões de TF consistiram de quatro escaladas na escada, com 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do rato, determinada na sessão anterior. Posteriormente, os fêmures foram retirados e, a expressão gênica, atividade da MMP-2 e conteúdo proteico de COL-1 foram analisadas. **Resultados:** foi identificado menor expressão gênica da SOST e MEPE nos grupos VT. A expressão gênica do COL-1 apresentou redução significativa nos grupos velhos, mas houve diferença no conteúdo proteico. A expressão das MMPs-2 e -13 bem como a atividade da MMP-2, apresentaram diminuição no envelhecimento, e não houve influência do treinamento. **Conclusão:** O TF demonstrou efeito protetor no osso envelhecido, sem alterar o conteúdo proteico estrutural e o remodelamento. Sugere-se que protocolos que adotem um tempo maior de treinamento podem gerar resultados mais favoráveis.

Palavras chaves: Osso, envelhecimento, treinamento de força, RT-PCR, Western Blotting, Zimografia.

Abstract

Bone is a dynamic tissue able to sustain impacts and, like other tissues, is affected negatively by aging. Its extracellular matrix properties become weakened, resulting in greater fracture risks. Exercises, as resistance training, are well established as attenuators of these deleterious effects, therefore, considering this context, biomolecular studies are crucial to explain such benefits in bone remodeling. **Objectives:** To identify aging effects on ECM, and resistance training as well, related to bone remodeling in rats. **Materials and methods:** 20 rats *Wistar novergicus albinos* were used, aged 3 and 20 months, and divided into four experimental groups (5 animals per group): young sedentary (YS), young trained (YT), old sedentary (OS), old trained (OT). A 12-week RT was conducted once every two days. Initially, the rats were adapted to the resistance training protocol, which required them to climb a vertical ladder with weights attached to their tails, making them perform from 8 to 12 movements per climb. The training sessions consisted of four ladder climbs with 65, 85, 95, and 100% of the rat's maximal carrying capacity, as determined in the previous session. Afterwards, femurs were dissected and MMPs gene expression, MMP-2 activity and COL-1 protein tissue content were analyzed. **Results:** there was reduced gene expression of SOST and MEPE in OT group compared to sedentary. COL-1 showed reduced gene expression in old groups, however it was not reproduced on proteic tissue content. MMP-2 and -13 expression and activity of MMP-2 were reduced in aged animals, and RT had no influence on these results. **Conclusion:** Resistance training showed protective effect on aged bone, without showing any alterations on proteic structural content and remodeling activity. Different protocols with longer periods of training may have more favorable results.

Keywords: Bone, aging, resistance training, RT-PCR, Western Blotting, Zymography.

Sumário

Introdução	11
Organização, função e composição do osso.....	11
Remodelamento ósseo.....	12
Vias de sinalização e a matriz extracelular	15
Envelhecimento do tecido ósseo	17
Exercício físico X Remodelamento ósseo.....	19
Objetivo geral.....	22
Objetivos específicos	22
Materiais e Métodos.....	23
Animais e grupos.....	23
Treinamento de Força.....	23
Eutanásia dos animais, retirada e armazenamento dos fêmures.....	24
Preparação da amostra e extração de RNA	24
RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction).....	24
Western Blotting	26
Zimografia.....	27
Resultados	28
Conclusão.....	35
Estudos futuros.....	36
Anexos.....	37
Referências Bibliográficas	38

Introdução

Organização, função e composição do osso

O esqueleto é um dos maiores sistemas do corpo, sendo um tecido conectivo que consiste de uma matriz mineralizada e uma unidade celular de remodelamento ativa (FENG & MCDONALD, 2011). Do nascimento ao envelhecimento, o tecido ósseo está sempre em atividade. O osso embrionário, primariamente formado por cartilagem fornecida por condrócitos, é usado como molde e substituído por um osso mineralizado formado pelas células específicas do osso (GRABOWSKI, 2015). Dois processos de ossificação dão origem aos ossos adultos, sendo a primeira a ossificação intramembranosa que dá origem a ossos chatos (como ossos do crânio e escápula), e a ossificação endocondral que origina ossos curtos (como ossos do tarso) e longos, como o fêmur e tíbia (MACKIE et. al., 2008).

Os ossos possuem funções que vão além da proteção dos órgãos, e ancoragem de tendões e ligamentos (BENJAMIN et. al., 2006). Ele é responsável pelo armazenamento do cálcio e fosfato, liberando esses íons conforme a necessidade do organismo. Porém, a produção de células progenitoras em seu compartimento medular é a função mais importante para conservação de todas as outras funções (ALFORD et. al., 2015). As células progenitoras de origem hematopoiética e mesenquimais podem ser consideradas a base do ciclo de remodelamento ósseo, pois a partir dessas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são originados e mantêm a homeostase do tecido ósseo (BRANDI, 2009).

Osteoblastos se originam de células tronco mesenquimais (do inglês, *mesenchymal stem cells*, MSC) localizadas principalmente na medula óssea vermelha. MSC são pluripotentes, e tem capacidade de originar além de osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos e fibroblastos, e para que sua diferenciação seja direcionada para a linhagem de células ósseas, fatores de transcrição e sinalização precisam ser aplicados a ela (GRABOWSKI, 2015). Elas passam por um processo de maturação onde se tornam primariamente pré-osteoblastos, continuando sua diferenciação até a célula madura osteoblástica. O osteoblasto é responsável por sintetizar componentes da matriz orgânica e controlar a mineralização dessa matriz (LONG, 2011).

Osteócitos, por sua vez, são osteoblastos diferenciados e aprisionados na matriz mineral óssea. São o destino final na linhagem osteoblástica, representando a última diferenciação nessa cadeia, porém não indiferentes ao ciclo de remodelamento ósseo (CAPULLI et. al, 2014). Essas células são fixadas na matriz mineralizada e comunicam-se através de canalículos e processos dendríticos, podendo sinalizar em várias camadas de osso, para ambos osteoblastos e osteoclastos um novo início do processo de remodelamento. Adicionalmente, funcionam como os principais mediadores na percepção da carga mecânica para o remodelamento estrutural do osso (CAPULLI et. al, 2014).

Osteoclastos são as células responsáveis pela degradação e reabsorção da matriz extracelular mineralizada, que exerce a sinalização para o amadurecimento proveniente de sua contraparte, os osteoblastos (VÄÄNÄNEN, 2000). Tem origem em células hematopoiéticas, assemelhando-se aos macrófagos e várias moléculas podem influenciar na produção e diferenciação. Eles desenvolveram maquinário eficiente para dissolver cristais de hidroxiapatita e degradar a matriz orgânica do osso rica em fibras de colágeno (VÄÄNÄNEN, 2000). Por compartilharem origem comum com células imunes, por se diferenciarem a partir de monócitos/macrófagos maduros e por terem papel fagocitário no osso, são chamados de macrófagos específicos do osso (ENDO-MUNOZ, 2012).

Em resumo, apesar das células ósseas possuírem características diferentes, suas funções são controladas e estimuladas por elas mesmas, em um ciclo próprio de remodelamento ósseo (HERNANDÉZ-GIL et. al, 2006).

Remodelamento ósseo

O processo de remodelamento ósseo ocorre de maneira elegante e coordenada. Em pequenas unidades funcionais multicelulares básicas (do inglês, *basic multicellular units*, BMU), ocorrem a formação e a quebra da matriz óssea pela linhagem de células osteoblásticas e osteoclásticas, respectivamente, que se responsabilizam por assumir essa função cíclica (ROBLING et. al., 2006). Osteoclastos são células que iniciam o processo de osteólise no espaço da BMU, destruindo e reabsorvendo a matriz mineralizada ao escavar túneis de aproximadamente 300 µm de diâmetro (VÄÄNÄNEN et. al., 2000). Para que a reabsorção seja desencadeada, uma série de atividades celulares precisam ser seguidas, iniciando pelo processo de migração e ancoragem dos osteoclastos ao local de degradação óssea, formação de uma lacuna de reabsorção, dissolução dos cristais de hidroxiapatita, degradação da matriz orgânica, remoção dos detritos ósseos da lacuna e, posteriormente, inativação do osteoclasto (VÄÄNÄNEN et. al., 2000). A lacuna formada entre o osteoclasto e a matriz óssea precisa de um meio ácido a fim de que a degradação dos componentes da matriz ocorra, pois, o fosfato de cálcio encontrado no meio extracelular é altamente sensível ao pH local (GRABOWSKI, 2015).

Após a reabsorção, um grupo de células osteoblásticas aderem-se a zona reabsorvida e secretam proteínas colagenosas (principalmente o colágeno tipo I), proteínas não-colagenosas (como a osteocalcina e a osteonectina) e proteoglicanas (CAPULLI et. al., 2014). Essa nova camada é chamada de osteóide, que é a matriz óssea não-mineralizada, não-rígida e incapaz de absorver impactos (CAPULLI et. al., 2014). Em um determinado ponto, a deposição óssea termina e os osteóides são calcificados para adquirir rigidez, em um processo de hidroxilação do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (fosfato tricálcico) que dá origem aos cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO})_6(\text{OH})_2]$, minerais que se acomodam aos espaços entre as fibrilas de colágeno e transforma a matriz

orgânica não-mineralizada em uma matriz inorgânica mineralizada rígida (HERNANDÉZ-GIL et. al., 2006).

Nesse modelo, a formação do osteóide é encontrada em locais específicos, sofrendo o processo de mineralização chamado de aposição mineral primária, que dura entre 5-10 dias. Seguido a esse período, acontece uma maturação gradual e lenta da matriz orgânica, em que a quantidade de cristais de hidroxiapatita e o aumento de tamanho destes chegam ao nível ideal, chamada de mineralização secundária (MEUNIER et. al. 1997).

Enquanto a matriz avança para o estágio mineralizado, osteoblastos são circundados e presos nessa nova matriz e se transformam nas células seguintes em sua linhagem, os osteócitos. Essas novas células, apesar da incapacidade de mobilizar-se pelo tecido mineralizado, adquirem uma função nova e complementam o ciclo de remodelamento ósseo. Os osteócitos são responsáveis pela percepção do estresse mecânico sobre o osso e sinalização para osteoblastos e osteoclastos do início de um novo ciclo. Comunicam-se entre si principalmente por uma rede de canalículos e junções gap, por onde percebem as mudanças da MEC (KOMORI et. al., 2013).

O processo de remodelamento é esquematizado na Figura 1.

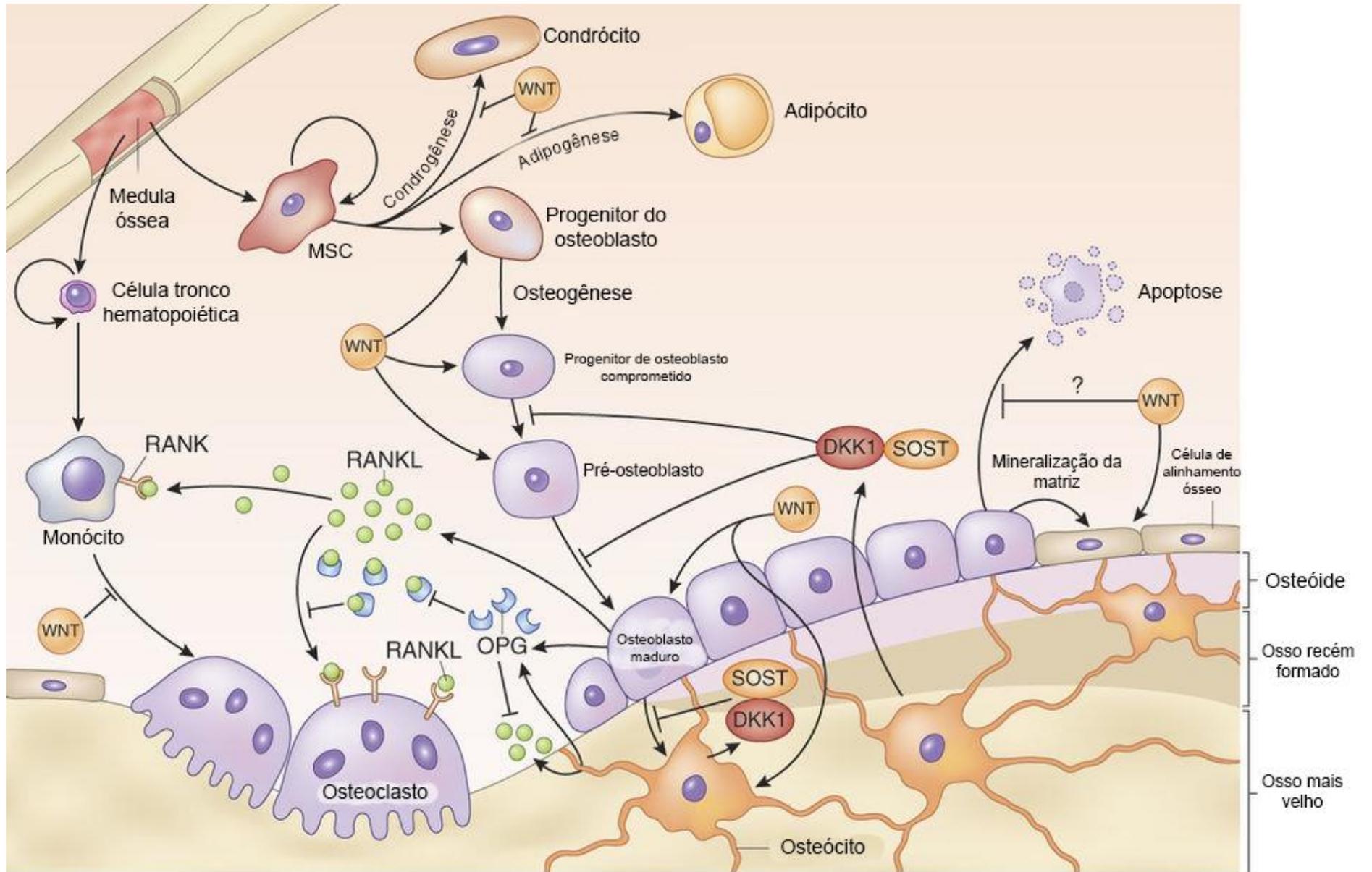


Figura 1. Representação gráfica do processo de remodelamento ósseo (adaptada de BARON & KNEISSEL, 2013). Células tronco mesenquimais são recrutadas da medula óssea com potencial de diferenciação em condrócitos, adipócitos ou osteoblastos. A via de sinalização Wnt direciona a diferenciação e maturação da linhagem osteoblástica, enquanto impede a proliferação dos outros tipos de células. O osteoblasto maduro produz o osteóide, e após mineralização da matriz, transforma-se em osteócitos (responsáveis pela sensibilização mecânica do osso). Entretanto, podem entrar em estágio quiescente, como células de alinhamento ósseo, ou sofrer apoptose. Os osteócitos podem inibir a diferenciação dos seus precursores, por meio da SOST e DKK1, e também controlar a diferenciação dos osteoclastos, ao produzir RANKL ou OPG. Os osteoclastos são diferenciados a partir das células tronco hematopoiéticas, e após ancoragem, reabsorvem a matriz mineralizada.

Vias de sinalização e a matriz extracelular

As células citadas anteriormente são participantes do processo de remodelamento ósseo, e são específicas do sistema esquelético, agindo e reagindo conforme a necessidade e sinalização da matriz extracelular (BOSKEY et. al., 2013). A matriz óssea possui duas fases: uma orgânica, composta por 90% de colágeno, 5% de proteínas não-colagenosas, aproximadamente 2% de lipídios e água. A outra fase, a inorgânica, composta de cristais de hidroxiapatita e células ósseas, mantém a função rígida do osso para absorção de impactos (BOSKEY et. al., 2013).

A via de sinalização Wnt canônica foi estabelecida como a principal via de regulação para diferenciação das células tronco mesenquimais em direção a linhagem osteoblástica. Em resumo, a sinalização inicia com o ligante Wnt conectando-se aos receptores frizzled e LRP5/6 na membrana celular, permitindo um acúmulo de β -catenina no citoplasma, que por sua vez é translocada ao núcleo da célula e inicia a transcrição de genes relacionados a diferenciação celular (BARON, KNEISSEL, 2013). A partir dessa etapa, fatores de transcrição e fatores de crescimento dão continuidade ao processo de maturação da célula para um osteoblasto funcional, capaz de repor a matriz óssea (KOMORI et. al., 2009; BRUDERER et. al., 2014). Por sua capacidade de diferenciação variada, as células tronco mesenquimais podem sofrer influência de outras proteínas que direcionam sua diferenciação para linhagens de células alheias ao tecido ósseo (CHEN et. al., 2011). Quando a presença dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) superam os fatores responsáveis pela diferenciação em osteoblastos, as células mesenquimais seguem um caminho de transformação em adipócitos, causando perda de tecido ósseo (CHEN et. al., 2011).

Após a diferenciação da célula tronco mesenquimal para a linhagem osteoblástica, é iniciado o processo de produção das proteínas necessárias para formação óssea (YOUNG et. al., 2003). O colágeno do tipo I é a proteína estrutural mais importante para o osso cortical e trabecular e corresponde a 90% do conteúdo do osteóide, o osso não-mineralizado. Essas cadeias

polipeptídicas no osso são heterotriméricas, sendo unidas em tríplice hélice, compostas de duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$, originando o colágeno tipo I (YOUNG et. al., 2003). Ao ser secretado, o colágeno liga-se aos seus semelhantes através de ligações cruzadas covalentes. Essas ligações podem ser fundamentais para a manutenção da estrutura óssea sob carga mecânica, pois possivelmente são as primeiras a romper e liberar energia, a fim de evitar lesões importantes na continuidade do osso (THOMPSON et. al., 2001). Essas ligações cruzadas entre fibras de colágeno são um importante fator de resistência para o tecido ósseo e, em condições fisiológicas, essas ligações diminuem conforme o envelhecimento (SAITO et. al., 2010). Por fim, o colágeno possui um papel de ancoradouro para diversas proteínas não-colagenosas (ROSS et. al., 2013; BORNSTEIN et. al., 2002).

A sinalização para transcrição de osteoclastos é alcançada por duas proteínas independentes, a primeira sendo o fator estimulante da colônia de macrófagos (do inglês, *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) e a segunda conhecida como ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa-B (do inglês, *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, RANKL). Enquanto M-CSF amplia a disponibilidade dos precursores de osteoclastos, o RANKL liga-se ao seu receptor específico, RANK, promovendo a maturação, diferenciação e inibindo a apoptose (TROUVIN et. al., 2010). Contudo, o RANKL possui um antagonista, que disputa o local no receptor a fim de promover o efeito contrário. A osteoprotegerina (OPG) compete sua ligação ao receptor RANK e inibe a diferenciação e maturação das células hematopoiéticas em osteoclastos, e conseqüentemente compromete a reabsorção óssea (BOYLE et. al., 2003). Todas as três proteínas citadas são produzidas pelas células da linhagem osteoblásticas, de maneira que a proliferação dos osteoclastos é conduzida pela presença de osteoblastos e osteócitos (KOMORI et. al., 2013). Para manter a homeostase óssea, essa sinalização entre RANKL e OPG precisa ser regulada adequadamente. A via Wnt em osteoblastos maduros controla a produção de OPG por essas células e já foi mostrado que mutações nessa via podem causar osteogênese imperfeita e iniciar um processo de osteoporose (TAKAYANAGI et. al., 2005; CAO et. al., 2005; GRABOWSKI, 2015).

Após a reabsorção e formação de uma nova matriz óssea, os osteócitos originados do aprisionamento dos osteoblastos na matriz, tem sua parte no ciclo de remodelamento. Eles produzem a esclerostina, uma proteína capaz de agir sobre seu antecessor, transcrita pelo gene SOST (WINKLER et. al., 2009). Essa proteína age na via de sinalização Wnt, inativando o receptor LRP5/6, impedindo a cascata de informação intracelular para diferenciação e maturação do osteoblasto (LI et. al., 2009). Em culturas celulares, a esclerostina foi observada por essa ação inibidora, e sua ausência elevou o nível de massa óssea de maneira exacerbada (POOLE et. al., 2005). Outra proteína exclusiva dos osteócitos, a MEPE (do inglês, *Matrix-Extracellular-Phospho-Glycoprotein with ASARM-motif*), parece ter uma função semelhante, porém sem tanto esclarecimento como a esclerostina (ATKINS et. al., 2011). Já foi observado que a massa óssea

e o conteúdo trabecular estão aumentados em ratos nulos à produção de MEPE, enquanto ratos com expressão aumentada da proteína apresentam fenótipo de osteoporose (GOWEN et. al., 2003). Contudo, resultados controversos também foram encontrados. Boskey et al. (2009), em seu estudo com um sistema de hidroxiapatita em gel, afirma que a MEPE em seu estado intacto inibe a mineralização óssea, porém quando clivada ela é uma promotora da mineralização. Ademais, Kulkarni et. al. (2010), reporta que em cultura de células osteocitárias sob estímulo mecânico, a MEPE é inibidora da osteoclastogênese, sendo, por conseguinte, regulatória na reabsorção óssea.

Assim como em vários tecidos corporais, as metaloproteinases (MMPs) também são fundamentais para o remodelamento da MEC em ossos. Elas são proteínas secretadas por células, capazes de degradar e remodelar a matriz extracelular adjacente, dissolvendo o colágeno estrutural (NAVARRO et. al., 2006; KADLER et. al., 2007). Contudo, seu papel parece ser abrangente e necessita mais estudos para elucidar sua exata função no tecido ósseo. Metaloproteinases possuem um papel fundamental no osso embrionário, degradando o osso imaturo formado por condrócitos e enviando sinais angiogênicos para vascularização do novo osso (GRABOWSKI, 2015). Aparentemente elas estão envolvidas em regular os fatores de crescimento, migração de osteoclastos e participação na mineralização óssea, apesar de estudos ainda estarem sendo conduzidos sobre o assunto (VU et. al., 2000). Seus tipos mais frequentemente associados ao desenvolvimento ósseo são MMPs -2, -9, -13, -14 e -16 (PAIVA et. al, 2014; LIANG et. al, 2016). Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS), parecem ser importantes como complemento e modulação da atividade das metaloproteinases (MURPHY et. al., 2005).

Envelhecimento do tecido ósseo

O osso, como todos os outros tecidos corporais, envelhece de maneira gradual e irreversível. O balanço ósseo resultante da atividade de formação e reabsorção fica desequilibrado. Com o avançar da idade, ocorre um declínio da força óssea por redução da densidade do osso trabecular e cortical, somando-se ainda a espessura e porosidade cortical, sendo esse último responsável em 76% da redução da força cortical (MCCALDEN et. al., 1993). As alterações moleculares e celulares causadas pelo envelhecimento incluem, mas não se limitam, ao aumento do estresse oxidativo no osso (ALMEIDA et. al., 2007), diferenciação osteoblástica diminuída (JILKA, 2010), diferenciação de células tronco mesenquimais para adipócitos em detrimento de células ósseas (ALMEIDA et. al., 2009; AKUNE et. al., 2004), diminuição de fatores de crescimento (XIAN et. al., 2012), apoptose aumentada de osteoblastos e osteoclastos (ALMEIDA, 2007b) e densidade de rede osteocitária diminuída em humanos (MANOLAGAS & PARFITT, 2010). O envelhecimento para as células progenitoras mesenquimais altera sua

capacidade proliferativa e de diferenciação. Ratos idosos já apresentaram altos níveis de proteínas oxidativas nessas células, enquanto a atividade de enzimas antioxidativas estava diminuída, em comparação com ratos jovens (STOLZING et. al., 2006).

Ademais, o processo de mineralização secundária confere rigidez ao osso, e o envelhecimento, pela atividade de turnover reduzida, leva a um desequilíbrio dessa qualidade óssea (MEUNIER et. al. 1997). Com o aumento da rigidez, haverá conseqüentemente um comprometimento da elasticidade, levando a menor tenacidade no osso, ou seja, a menor capacidade do osso em absorver energia antes de fraturar (PANWAR et. al., 2017). Logo, é fundamental ressaltar que o aumento exacerbado de rigidez óssea é capaz de comprometer a estrutura física do osso, pois a capacidade do mesmo em absorver impactos fica reduzida.

Quarto et. al. (1995), comparou a quantidade de células mesenquimais progenitoras no osso de ratos jovens e adultos, observando uma quantidade significativamente menor delas com o envelhecimento. Em contrapartida, Chen et. al. (2004) relatou a partir de suas observações uma quantidade mais significativa de células progenitoras mesenquimais em ratos idosos, contudo, ocorria uma falha na diferenciação dessas células para a linhagem osteoblástica. Em revisão da literatura, Gibon et. al. (2016) afirma que o envelhecimento compromete a disponibilidade e o crescimento das células mesenquimais progenitoras para formação óssea e, apesar de não haver consenso, possivelmente o potencial de diferenciação osteogênico dessas células também está diminuído. Tais alterações decorrentes do envelhecimento causam um déficit na produção de osteoblastos, principal unidade da formação óssea.

Estresse oxidativo possui um papel benéfico no tecido, como um ativador de resposta imune, mediado pela concentração das espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*, ROS). Contudo, durante o envelhecimento, o desequilíbrio entre ROS e os antioxidantes endógenos podem desencadear complicações degenerativas celulares no osso (WAUQUIER et. al., 2009).

Há uma divergência na literatura quanto a correlação entre a perda de massa muscular e massa óssea decorrentes do envelhecimento, em humanos. Marcus et. al. (1995), em revisão na literatura afirma que apesar da perda de massa óssea e massa muscular ocorrerem concomitantemente, a perda óssea emerge muito antecipadamente em comparação à perda de massa muscular no decorrer dos anos. Logo não se pode inferir uma ligação direta entre esses acontecimentos. Porém, Calmels et. al. (1995) em um estudo que correlacionou força muscular isocinética de membros superiores e inferiores com densidade mineral óssea de mulheres entre 44 e 87 anos, observou associação direta entre essas variáveis, sendo vista primeiramente em membros superiores, entre a quinta e sexta década de vida, e em membros inferiores posteriormente, após a sexta década. Mais recentemente, Verschueren et. al. (2013), em um estudo coorte com 679 homens europeus de meia-idade e idosos, buscou a correlação entre sarcopenia, reduzida massa óssea e osteoporose, e encontrou associação entre essas variáveis. Homens com

baixa massa muscular tiveram menor densidade de massa óssea e mais propensão à osteoporose quando comparados a homens não-sarcopênicos. Isso nos leva a acreditar que pode ocorrer certa influência da contração muscular ao causar estresse mecânico sobre o osso e regular assim a densidade mineral deste tecido.

Exercício físico X Remodelamento ósseo

Henderson et. al. (1998), afirma que a atividade física pode otimizar a densidade mineral óssea e melhorar a qualidade do osso por causar mudanças na sua geometria e arquitetura. Bonet et. al. (2010), em acordo com outros estudos, revisou que o exercício físico pode influenciar o sistema esquelético de maneira direta, através do impacto, ou indireta, através da contração muscular ou ainda modificando níveis de determinados hormônios que possuem papel no metabolismo do cálcio. O impacto direto é percebido pelos osteócitos, porém seu mecanismo de ativação como receptor mecânico não é bem elucidado. A resposta celular pode ser dada por despolarização de dendritos no osteócitos, que desencadeiam mudanças elétricas de membrana. Ocorre sinalização para os osteoblastos, e posteriormente, osteoclastos seguindo-se assim o *turnover* ósseo. Mauney et. al. (2004), observou esse efeito em um estudo *in vitro* com tecido ósseo estimulado por vibração, em que células da linhagem osteoblásticas se proliferaram com mais intensidade por sinalização proveniente de osteócitos.

Há na literatura estudos que comprovam o efeito protetor do exercício físico no osso susceptível a osteoporose. Ocarino et. al. (2007), conduziu um estudo com ratas osteopênicas em modelo de treinamento aeróbico em esteira sem inclinação. Observou-se um aumento do volume do osso trabecular na vértebra e ossos longos, e espessura cortical da vértebra. Lacerda et. al. (2015), realizou um estudo de treinamento de força com ratos de 21 semanas de idade, sob ingesta de dieta rica em carboidratos, objetivando conferir a relação do exercício aeróbico com perda de peso e remodelamento ósseo. Constatou que a atividade física inibiu a osteopetrose, o aumento da matriz mineralizada de forma anormal, em vértebras, causada pela obesidade. A porcentagem de osso trabecular nas vértebras e fêmures proximais também foi aumentada, e observou que o osso nasal de ratos, que não recebe carga durante o exercício, também obteve aumento de espessura. Esse fato, foi atribuído a melhora sistêmica causada pela atividade física e a produção de hormônios que agem também no tecido ósseo, afirmando então que o exercício é um bom recurso para manter a homeostase do osso. Howe et. al. (2011), publicou por meio de revisão bibliográfica a análise de 43 estudos randomizados controlados, com um total de 4320 mulheres em período pós-menopausa, e descreveu o exercício de força progressivo resistido em membros inferiores como a intervenção mais efetiva para densidade mineral óssea da cabeça do fêmur, que apesar de pequena significância estatística, demonstrou ser a intervenção mais segura e efetiva.

Em um estudo com citocinas que influenciam no remodelamento ósseo, Smith et. al. (2016) observou queda na produção de proteínas osteoclastogênicas em sujeitos adultos comprometidos com programa de exercícios, incluindo exercícios resistidos, em um período de 6 meses. Em contrapartida, citocinas anticlastogênicas tiveram sua quantidade sérica incrementada, assim como aumento da osteocalcina. Pode se inferir que esse programa de exercícios teve efeito positivo na produção óssea, inibindo a degradação da matriz.

Estudos já foram conduzidos para observar o efeito do exercício em ratos, em diversas situações. Foi mostrado aumento significativo na atividade da MMP-2 do tendão calcâneo (TC) de ratos que realizaram salto vertical na água (4 séries/10 saltos, 30 segundos de repouso entre as séries, 5 dias/semana, 5 semanas, carga de 50 a 70% do peso corporal do animal) (Marqueti et al., 2006; Marqueti et al., 2008). Além disso, recentemente nós demonstramos que o treinamento de força (metodologia similar a utilizada nesse projeto) aumentou o remodelamento da MEC, tanto em músculos quanto em tendões (Prestes et al., 2009; Pereira et al., 2010). Shiguetomo et. al. (2012), ao realizarem o mesmo protocolo de treinamento de força do presente estudo, em ratas ovariectomizadas com 13 semanas de idade, observaram aumento da atividade da MMP-2 nos grupos intactos e ovariectomizados treinados cronicamente. Ainda houve aumento significativo da densidade óssea, densidade mineral e resistência à carga de fratura nos grupos treinados cronicamente.

Nesse contexto, as hipóteses desse trabalho são:

1) As propriedades de MEC se alteram com o envelhecimento como: diminuição do conteúdo de colágeno, diminuição do número de células capazes de responder ao estímulo mecânico, redução da expressão e atividade de MMPs, aumento da expressão de genes relacionados ao enfraquecimento ósseo, diferenciação das células mesenquimais para a linhagem de adipócitos em detrimento à linhagem osteoblástica;

2) O treinamento de força poderá minimizar essas alterações da MEC no processo de envelhecimento, favorecendo o processo de remodelamento, indicando uma inibição da degradação óssea.

Esses achados trarão grande contribuição para a compreensão dos mecanismos associados às alterações de remodelamento da MEC em ossos durante o envelhecimento biológico. Além disso, a utilização do treinamento de força poderá minimizar esses efeitos deletérios do envelhecimento, favorecendo o processo de reabilitação física. Alguns aspectos que serão estudados aqui são inéditos na literatura científica e trarão grande contribuição para a ciência básica, no que tange o entendimento do remodelamento da MEC, bem como para a aplicação nas áreas de reabilitação e promoção de saúde em geriatria/gerontologia.

Sobre os genes propostos para estudo no presente trabalho, sua relação com o envelhecimento e treinamento de força pode ser encontrada na Tabela I.

TABELA I – Relação de proteínas que serão analisadas no presente estudo e os dados encontrados na literatura sobre sua expressão no exercício resistido e no envelhecimento.

Gene/Proteína	Função na matriz extracelular óssea	Expressão no exercício resistido em tecido ósseo	Expressão no envelhecimento em tecido ósseo
Col-1	Principal proteína estrutural da matriz extracelular. Produzida por células da linhagem osteoblástica. (KULTERER, 2007)	Expressão incrementada por consequência do aumento de células osteoblásticas (VICENTE et. al., 2013).	Conteúdo diminuído por maior degradação e enfraquecimento de suas ligações cruzadas. (YOUNG, 2003).
SOST - Esclerostina	Inibidor de formação óssea. Expressa principalmente pelos osteócitos. Antagoniza BMPs. (LIN, 2009)	Expressão reduzida quando em estímulo mecânico. (ROBLING, 2008) Exercícios de baixo-volume e alta-intensidade em microgravidade diminuíram expressão de SOST e aumentaram formação óssea. (MACIAS, 2012)	Diminui com o envelhecimento, mas não influencia na diferenciação de osteoblastos, como seria esperado. (SHAHAZARI, 2012)
MEPE	Regula homeostase do fosfato e inibe mineralização óssea. (GOWEN, 2003)	Sem dados para exercício resistido. Estímulo mecânico aumentou expressão gênica da MEPE, que interage com OPG, e consequentemente diminui osteoclastogênese. (KULKARNI, 2010)	Expressão aumentada em pacientes com quadros de osteoporose e osteomalacia (NAMPEI et. al., 2004).
PPAR γ	Fator chave de transcrição das MSC em adipócitos. Concorre com fatores de transcrição dos osteoblastos (ZHANG et. al., 2016)	Sem dados para exercício resistido. Treino em esteira previne a perda óssea por inibição da PPAR γ . (CHEN et. al., 2011; MAREDZIAK et. al., 2015)	Expressão aumentada no envelhecimento, indicando maior adipogênese (ZHANG et. al., 2016).
MMP-2	Degradação da matriz óssea, sinergia com outras metaloproteinases (PAIVA, 2014)	Atividade aumentada com treinamento de força crônico de alta-intensidade em ratas ovariectomizadas. (SHIGUEMOTO, 2012)	Sem dados encontrados para envelhecimento.
MMP-9	Migração do osteoclasto. Degradação da matriz óssea. (PAIVA, 2014, DELAISSE, 2003)	Sem dados encontrados para exercício resistido.	Sem dados encontrados para envelhecimento.
MMP-13	Degradação da matriz óssea. Promove ossificação endocondral (PAIVA, 2014).	Sem dados encontrados para exercício resistido.	Sem dados encontrados para envelhecimento.
TIMP-1	Inibidor da ação de degradação das metaloproteinases. (HILL, 1994)	Sem dados encontrados para exercício resistido.	Sem dados encontrados para envelhecimento.

Objetivo geral

Avaliar os efeitos do envelhecimento, bem como o efeito do treinamento de força sobre as propriedades da MEC importantes para o remodelamento ósseo em ratos.

Objetivos específicos

Avaliar por meio de PCR em tempo real alguns dos principais genes responsáveis pelo remodelamento ósseo.

Avaliar por meio de zimografia a atividade da MMP-2 tecidual.

Avaliar por meio de *western blotting* o conteúdo proteico do colágeno tecidual.

Materiais e Métodos

Animais e grupos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 20 ratos, *Wistar novergicus albinos* de 3 (jovens, n = 10) e 20 meses (velhos, n = 10), provenientes do Biotério Central da UNESP (Campus de Botucatu). Os ratos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício desta universidade em temperatura ambiente entre 22 e 24°C com luz controlada em ciclo de 12 h (claro-escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. O experimento foi conduzido segundo as normas de ética na experimentação animal (National Research Council, 2011; DBCA/CONCEA, 2013). Esse projeto, foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (processo nº: 031/2011).

Os ratos foram então divididos em quatro grupos experimentais, com 5 animais cada: Jovens Sedentários (JS), Velhos Sedentários (VS), Jovens Treinados (JT) e Velhos Treinados (VT). Os grupos sedentários foram mantidos sem realizar treinamento de força, enquanto os treinados seguiram o protocolo de treinamento de força.

Treinamento de Força

O treinamento de força (TF) de 12 semanas foi realizado uma vez a cada dois dias. Inicialmente, os ratos foram adaptados ao protocolo de TF que exigiu que os animais escalassem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2-cm, inclinação de 80°). O tamanho da escada fez com que os animais realizassem 8-12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso na porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva. Com o aparato fixado à cauda, os ratos foram colocados na parte inferior da escada e familiarizados com a mesma. Caso necessário, um estímulo com pinça seria aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada os ratos alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram durante 2 minutos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem estímulo. Três dias após esta familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4-8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistiu em carregar uma carga de 75% do peso corporal do animal. Em seguida, foi adicionado um peso de 30g até uma carga com a qual o rato não conseguisse escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguiu progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento do rato para aquela sessão de treinamento. As sessões de treinamento consistiram de quatro escaladas na escada, com 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão

anterior. Durante as escaladas subsequentes foram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada. O protocolo de TF apresenta metodologia similar aos usados em humanos e foi o adaptado de Hornberger e Farrar (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo.

Eutanásia dos animais, retirada e armazenamento dos fêmures

Após 48 h do término do período experimental, todos os procedimentos experimentais foram realizados com os animais anestesiados, utilizando-se injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12 mg/Kg/peso corporal) e quetamina (95 mg/Kg/peso corporal). Após, os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as patas presas e mantidas em extensão, para assim efetuar a dissecação dos fêmures. Os ossos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C , para análises moleculares.

Preparação da amostra e extração de RNA

A cabeça e o colo do fêmur dos ratos de cada grupo foram usados para análise. Inicialmente as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com um pistilo e homogeneizadas no reagente TRIZOL (Invitrogen Corporation, California, USA) com um homogeneizador PowerGen 125 (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). Após homogeneização, a amostra manteve-se separada em três partes, onde a primeira é caracterizada pela presença de RNA, sendo usada para o protocolo de PCR em tempo real. A segunda fase composta por DNA foi descartada, enquanto a terceira fase composta por proteínas foi aplicada no protocolo de Western Blotting. Após o isolamento da fase aquosa, o RNA será precipitado usando isopropanol. O pellet foi lavado em etanol e subsequentemente dissolvido em 10ul de água livre de RNases e armazenado em -80°C . A mensuração da concentração e pureza (260/280 nm e 260/230 nm) do RNA foram feitas no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)

Antes da transcrição reversa, o RNA total (1 μg) de cada amostra foi tratado com deoxyribonuclease I (DNase I; Invitrogen Corporation, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante de maneira a remover DNA genômico. Após isso, o RNA tratado foi reversamente transcrito em cDNA utilizando o *Kit iScriptTM cDNA Synthesis* (BioRad Laboratories, USA).

O sistema de detecção para PCR em tempo real CFX 96 (Bio-Rad, San Francisco, USA) foi usado para a reação qPCR. Para cada reação, 20 ng de cDNA, 0,2 μg de cada primer e 5 μg de

SsoFast™ Evagreen Supermix (Bio-Rad, San Francisco, USA) foram usados em um volume total de 10 µL por reação. Os *primers* específicos de cada gene descritos na tabela I foram comprados da Sigma Aldrich (Missouri, EUA) e da Bioneer (Republic of Korea). O programa de ciclagem térmica foi de 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15s a 95°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C. Após a corrida, a curva de melting foi analisada para confirmar a especificidade dos produtos amplificados. Proteína ribossomal S18 (RPS18) foi usada como gene de referência. A expressão relativa dos produtos de qRT-PCR foi determinada por meio do método $\Delta\Delta C_t$, em que a expressão relativa é calculada usando a seguinte equação: $fold\ induction = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK, 2001).

O objetivo principal da técnica de PCR em tempo real em nosso estudo foi observar a variação de um determinado gene e oferecer campo para hipotetizar sobre sua importância quanto a intervenção utilizada. Nesse trabalho o PCR será utilizado para embasar nossas hipóteses sobre a atividade física e o envelhecimento, em que será possível determinar qual gene é expresso em maior escala nessas duas situações, nos fornecendo uma ideia sobre a condição no remodelamento ósseo.

A sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados é encontrada na tabela II.

TABELA II – Descrição da sequência de primers utilizados no estudo.

Genes	Primer Senso (5'-3')	Primer Antisenso (3'-5')	Acesso n°	Empresa
COL-1	ATCAGCCCAAACCCCAAGGAGA	CGCAGGAAGGTCAGCTGGATAG	NM_053304.1	Bioneer
MEPE	ACTGTTCTCTTTCAGTATGAC	TGATATTTCTGAGGAGGGTG	NM_024142.1	Sigma Aldrich
SOST	ATGATGCCACAGAAATCATC	CACGTCTTTGGTGCATAAG	NM_030584.1	Sigma Aldrich
PPAR γ	AAGACAACAGACAAATCACC	CAGGGATATTTTTGGCATACTC	NM_013196.1	Sigma-Aldrich
MMP-2	GATCTTCTTCTTCAAGGATCG	TACACGGCATCAATCTTTTC	NM_031054.2	Sigma Aldrich
MMP-9	TACTTTGGAAACGCAAATGG	GTGTAGAGATTCTCACTGGG	NM_031055.1	Sigma Aldrich
MMP-13	CGTGTGGAGTTATGATGATG	ATCTACTTTGTCGCCAATTC	NM_133530.1	Sigma Aldrich
TIMP-1	ATAGTGCTGGCTGTGGGGTG	TGATGCCTCTGGTAGCCCTT	NM_053819.1	Bioneer
RPS18	ACTGCCATTAAGCGTGTG	GTCAGGGATCTTGTATTGTC	NM_213557.1	Sigma-Aldrich

Western Blotting

Após a homogeneização da amostra em TRIZOL na extração de RNA, foi feito a ressuspensão de proteínas a partir da a terceira fase obtida conforme o manual do fabricante do TRIZOL. As proteínas foram precipitadas em 2ml de isopropanol, seguida pela lavagem em tampão composto por 0,3M de hidrócloro de guanidina em etanol a 95%. Foi adicionado 99mL de SDS 1% e 1mL de inibidor de protease (Sigma Aldrich) ao pellet de proteínas, e dissolvido em banho quente na temperatura de 60°C. Após ressuspensão das proteínas, a quantificação foi feita no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

As amostras foram concentradas em 30 μ g de proteína e 4 μ l de tampão de amostra concentrado em 6x com β -mercaptoetanol (agente redutor) e foram resolvidas por eletroforese em gel de poliácridamida à 10%. Após, foi feita a transferência de proteínas em membrana de PVDF (Merck Millipore), e bloqueio da membrana em leite. Em seguida foi realizada a incubação com anticorpo primário para colágeno do tipo I (Sigma Aldrich, C2456), como proteína de interesse. Após incubação primária overnight, foi incubado com anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG-HRP* (Santa Cruz Biotechnology, Sc-2005) e revelado com reagente de revelação *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Amersham, RPN2232) em fotodocumentador. A densitometria das bandas foi feita no software ImageJ™ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) e normalizada pelo anticorpo *anti β -actin, mouse monoclonal* (Sigma Aldrich, A1978).

Zimografia

Os procedimentos para determinação da atividade da MMP-2 no osso foram realizadas de acordo com o protocolo adaptado de Marqueti et. al. (2008). A porção imediata logo abaixo do colo do fêmur foi removida e macerada em nitrogênio líquido com pistilo. Após a amostra foi incubada em 500 μ L de tampão de extração (ácido cacodílico 10 mM, pH 5,0; NaCl 0,15 M; ZnCl₂ 1M; CaCl₂ 20mM; NaN₃ 1,5 mM; Triton X-100 0,01% [v / v]), a 4 °C overnight. Após este período, a solução foi centrifugada por 10 min (13000 g, a 4 °C). Amostras com 15 mg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS 10% e gelatina na concentração de 1mg/ml. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes em 40 minutos com solução 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS e incubados em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; CaCl₂ 5 mM; NaN₃ 0,02%; ZnCl₂ 10 nM) a 37 °C por 20 h. Os géis foram corados com Comassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) por 1h e descorados com ácido acético: metanol: água (1:4:5, v:v:v), para visualização das bandas de atividade. A densitometria das bandas foi feita no software ImageJ™ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Resultados

Efeito do envelhecimento

Algumas alterações no osso foram observadas pelos resultados da expressão gênica quando consideramos apenas o fator envelhecimento sem influência do treinamento. A expressão gênica de COL-1 apresentou diferença significativa, com expressão diminuída no grupo VS quando comparado ao grupo JS (Figura 2a). Por outro lado, os resultados de conteúdo proteico do colágeno tipo I não demonstraram diferença entre os grupos (Figura 3).

Também foi observada diferença significativa da expressão da SOST, a qual aumentou no grupo VS quando comparado ao grupo JS (Figura 2b). A expressão gênica da MEPE não apresentou diferença significativa entre os grupos JS e VS ($p=0,7519$) (Figura 2c).

Com relação às metaloproteinases, considerando o envelhecimento ósseo, foram encontrados resultados semelhantes na expressão gênica e atividade da MMP-2 no tecido. O grupo VS apresentou expressão gênica diminuída comparado ao JS (Figura 2e), tendo resultado semelhante quando observada a atividade total da MMP-2 por meio de zimografia (Figura 4). TIMP-1 e MMP-13 também mostraram a expressão diminuída no grupo velho comparado ao jovem, ambos sedentários (Figura 2g, h).

O efeito do treinamento de força

Quando considerado os efeitos do treinamento de força no grupo JT, o COL-1 não apresentou diferenças significativas na expressão gênica (Figura 2a). Porém, TF não conseguiu proteger a redução da expressão de COL-1 no grupo VT.

Com relação à SOST, não foi demonstrada diferença significativa entre os grupos VT e JT ($p=0,7192$) (Figura 2b).

A expressão gênica da MEPE foi alterada após TF, no qual o grupo JT mostrou aumento significativo na MEPE quando comparado com o grupo VT ($p=0,0020$) (Figura 2c). PPAR γ não obteve diferença significativa em nenhum grupo experimental (Figura 2d).

O treinamento de força aumentou significativamente a expressão gênica da MMP-2, MMP-9, MMP-13 e TIMP-1 quando comparado o grupo VT com JT ($p=0,0049$, $p=0,0100$, $p=0,0011$ e $p=0,0001$, respectivamente; Figura 2e, f, g, h). O TIMP-1 e a MMP-13 do grupo JT também apresentaram aumento significativo na sua expressão quando comparados com o grupo JS ($p=0,0488$ e $p=0,0120$, respectivamente). Os achados por meio de zimografia corroboraram os resultados da expressão gênica, na qual a atividade total da MMP-2 no grupo VT foi significativamente menor que no grupo JT (Figura 4).

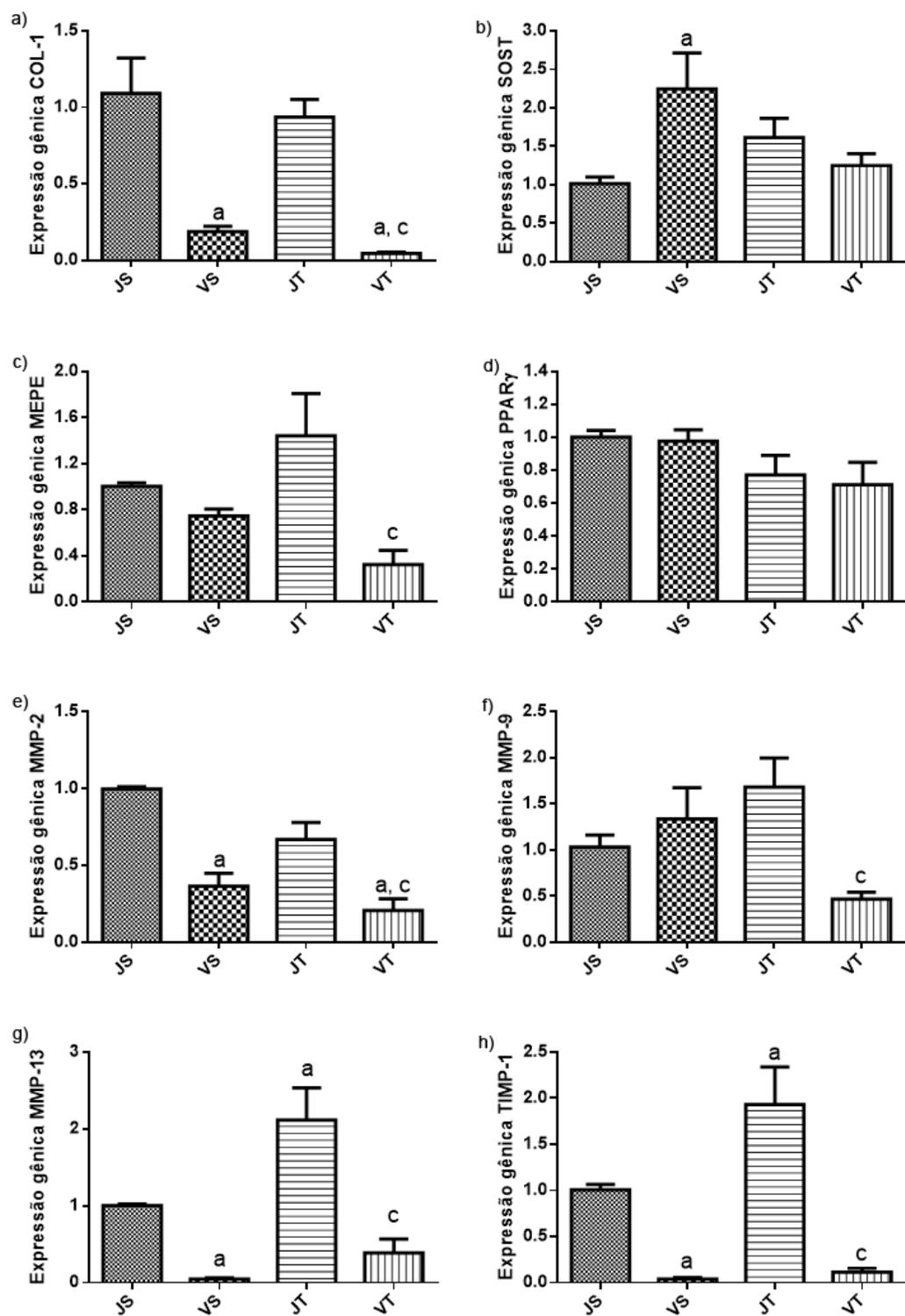


Figura 2. Análise da expressão gênica de a) COL-1, b) SOST, c) MEPE, d) PPAR γ , e) MMP-2, f) MMP-9, g) MMP-13 e h) TIMP-1 nos fêmures esquerdos dos animais dos grupos experimentais. Diferenças significativas: a vs. JS; b vs VS; c vs JT; d vs VT, $p < 0,05$

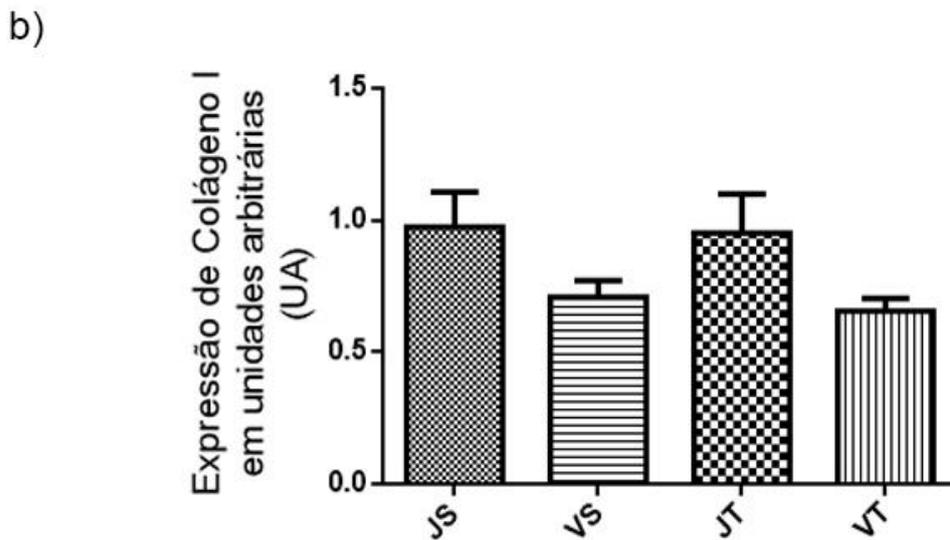
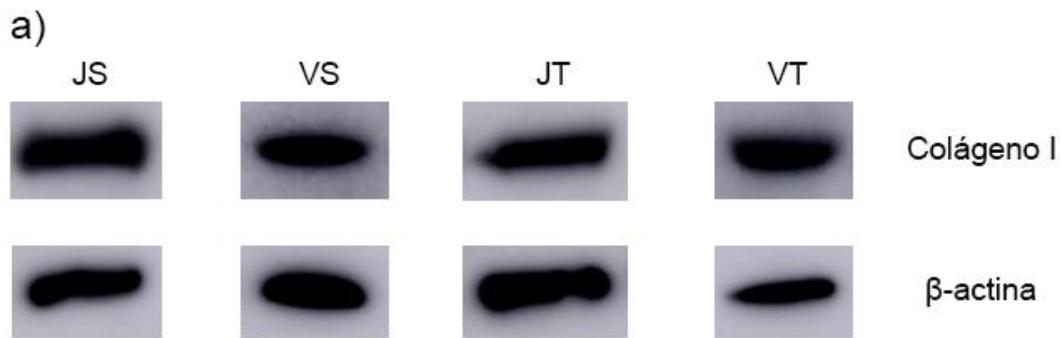


Figura 3. A) Densitometria do colágeno tipo I nos grupos experimentais, normalizada pela β -actina. B) Representação gráfica do conteúdo proteico do colágeno tipo I em unidade arbitrária (UA) em fêmures. Não apresentou diferenças significativas. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; VS, Velho Sedentário; VT, Velho Treinado.

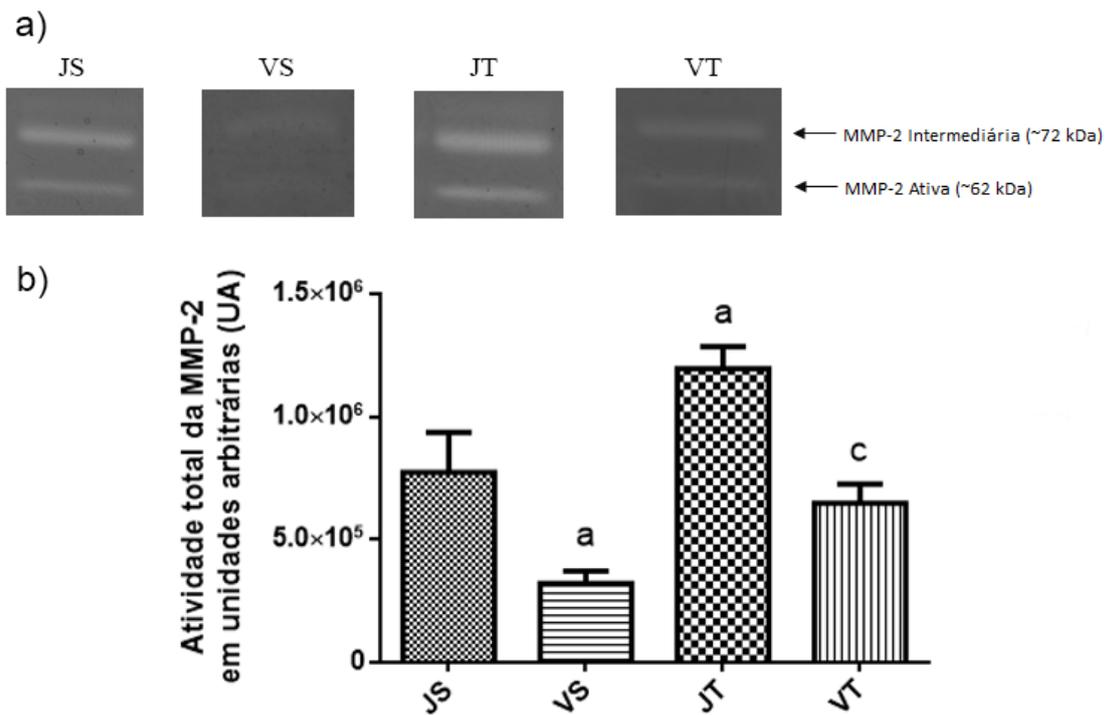


Figura 4. A) Densitometria da atividade da MMP-2 total = MMP-2 Pro (~72 kDa) e MMP-2 ativa (~62 kDa) em fêmures. B) Representação gráfica da atividade total da MMP-2 (MMP-2 pro + MMP-2 ativa) em unidade arbitrária (UA) em fêmures. Diferenças significativas comparadas com: a. vs JS; c. vs JT, $p < 0,05$ ($n = 5$ por grupo). JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; VS, Velho Sedentário; VT, Velho Treinado.

Discussão

Os principais achados do presente estudo confirmam que o envelhecimento acarreta efeitos deletérios nas propriedades moleculares e propriedades estruturais da MEC levando ao enfraquecimento ósseo em animais velhos. Dentre os achados, destaca-se o efeito do TF na redução da expressão gênica da SOST e MEPE, sugerindo um efeito inibitório na reabsorção óssea. O TF também promoveu uma maior expressão gênica e atividade das MMPs no grupo jovem, conferindo melhor remodelamento.

O colágeno tipo I, principal proteína estrutural do osso (YOUNG, 2003), apresentou expressão gênica reduzida em ambos os grupos velhos, embora não houve variação em seu conteúdo proteico. Observou-se que a expressão de COL-1 não foi influenciada pelo TF, e a provável diminuição da síntese dessa proteína culminará futuramente em menor resistência tecidual (FONSECA et. al., 2013). Kesavan et. al. (2005) aplicaram carga mecânica por meio de dispositivo (2 semanas, 6 dias por semana) sobre tíbias de camundongos fêmeas com idade entre 2 meses e 9 meses de idade, e demonstraram aumento da expressão gênica de COL-1, porém utilizaram um protocolo de aplicação de carga por apenas 10 dias. Não obstante, Holguin et. al. (2016) realizaram treinamento semelhante, com carga mecânica aplicada em tíbias de camundongos (2 semanas, 5 vezes por semana), e reportaram expressão de COL-1 aumentada em ratos com 5 meses de idade, porém diminuída em ratos com 22 meses de idade, corroborando os nossos resultados. Em estudos com seres humanos, períodos maiores de treinamento podem potencializar os efeitos positivos na densidade mineral óssea, que intrinsecamente se relaciona ao COL-1. Por exemplo, Whiterford et. al. (2010) realizaram TF com homens idosos pelo período de 1 ano (1 sessão por semana, 3 séries de 8 repetições máximas) e observaram aumento da DMO total de quadril para o grupo treinado, assim como a massa magra, capacidade funcional de marcha e força muscular de membros inferiores. Nesse estudo a expressão de COL-1 foi reduzida com o envelhecimento e não foi observado efeito protetor do TF no sentido de impedir ou inibir esse efeito. Apesar disso, o conteúdo do COL-1 tecidual se manteve. Baseado nos estudos acima acreditamos que esse efeito talvez esteja relacionado ao tempo de treinamento. Possivelmente períodos maiores de treinamento poderiam gerar melhora na expressão e conteúdo do COL-1, contudo há escassez de estudos com protocolos de treinamentos por longos períodos em modelos experimentais em animais.

Com relação a SOST, o envelhecimento pode acarretar efeitos deletérios na formação óssea, devido ao aumento desse gene (HOLGUIN et. al., 2016). Para entender melhor, a proteína transcrita pela SOST chamada de esclerostina, é produzida principalmente por osteócitos, e atua inibindo a atividade dos osteoblastos e posteriormente provoca apoptose celular, o que pode contribuir para o efeito negativo sobre a formação óssea (GOMBOS et. al. 2016). De forma análoga, a MEPE é uma proteína expressa especificamente por osteócitos e possui papel crucial no controle da captação de fosfato pelo tecido ósseo, inibindo sua mineralização quando em alta

quantidade ou expressão (ZELENCHUK et. al, 2015; BOSKEY et. al, 2009). Os resultados do presente estudo estão de acordo com as investigações anteriores (NAMPEI et. al., 2004; GOOI et. al., 2014; KHASSAWNA et. al., 2015), as quais avaliaram a influência do envelhecimento nesses dois genes e demonstraram um aumento exacerbado no envelhecimento.

No atual estudo, o TF parece ter induzido um efeito ósseo protetor nos animais velhos, pois foi capaz de manter a expressão da SOST em níveis basais e dessa forma inibir as vias de absorção óssea. Holguin et. al. (2016), estudaram em modelo animal, o efeito da carga mecânica aplicada sobre a tíbia de camundongos (5 x semana, por 2 semanas) em ratos com 5, 12 e 22 meses de idade. Os animais mais velhos, apresentaram diminuição da SOST imediatamente após a aplicação de carga, mas curiosamente não manteve esse resultado em período prolongado, com consecutivas cargas mecânicas aplicadas. A discrepância entre este resultado e o do presente estudo pode ser devida, pelo menos em parte, às diferenças referentes à intensidade, ao volume, bem como ao tipo e duração dos protocolos de carga mecânica empregados. Ademais, Holguin et al. 2016 utilizam a tíbia, o que pode ser um fator de influência para resultados distintos.

Similarmente, os resultados da expressão gênica da MEPE nos direcionam à hipótese do efeito protetor acarretado pelo TF. O resultado encontrado nesse estudo, demonstra que o TF resultou em menor expressão da MEPE nos animais VT, indicando, indiretamente, efeitos benéficos sobre a mineralização óssea. A análise biomecânica realizada por Bogni (2013) no fêmur direito desses mesmos grupos experimentais, demonstraram conteúdo mineral semelhante em todos os animais e rigidez aumentada nos grupos VS e VT (ANEXO I), salientando, porém, que os animais velhos treinados apresentaram menor rigidez comparado com os animais sedentários. Esses achados corroboram os resultados da expressão gênica da SOST e da MEPE nesse estudo, pois o treinamento atenuou o aumento da expressão desses genes minimizando os efeitos negativos sobre a formação óssea dos animais velhos.

O envelhecimento também reduziu a expressão gênica da MMP-2, -9 e -13, bem como a atividade da MMP-2 no fêmur. Ademais, o TF por 12 semanas não conseguiu atenuar os efeitos deletérios do envelhecimento em nenhum dos grupos. Baseado nesses resultados, pode-se inferir que o remodelamento da matriz óssea está diminuído nos grupos velhos, haja vista que as metaloproteinases possuem função importante no processo de degradação e formação da matriz óssea (PANWAR et. al., 2017; DELAISSE et. al., 2003). O remodelamento comprometido aumenta a rigidez óssea, e as microfraturas geradas pelo impacto podem se acumular, causando fragilidade e maior risco de fraturas importantes, principalmente em idosos. Com relação ao resultado do TIMP-1, inibidor da atividade das metaloproteinases -2 e -9 (VANDOOREN et. al., 2013), sua diminuição pode indicar uma ação tecidual na tentativa de preservar a pequena atividade de MMPs remanescente no tecido.

Ainda sobre as MMPs, a MMP-2 e -13 possuem função no remodelamento ósseo, tendo ainda a MMP-2 papel na formação dos canalículos para comunicação de osteócitos, entre eles e

com outras células (INOUE et. al., 2006), logo entendemos que sua diminuição representa um comprometimento na mecanotransdução percebida pelos osteócitos. A mecanosensibilidade no osso depende da rede osteocitária íntegra, com células maduras e fluido capaz de sinalizar as modificações necessárias para adaptação da MEC à carga (PRIDEAUX et. al., 2016). Baseando-se nisso, é possível explicar nossos achados sobre a MMP-9, que apresentou redução da expressão gênica apenas no grupo velho treinado. Já foi descrito na literatura uma associação dos osteoclastos com a MMP-9. Quando essa célula está ancorada à matriz mineralizada, a MMP-9 é liberada juntamente com outras enzimas para degradação da matriz (HILL et. al., 1994). O amadurecimento dos osteoclastos para seu estado funcional é sinalizado pelos osteócitos (SCHAFFLER & KENNEDY. 2012), e estando esse último com sua comunicação comprometida, implica consequentemente em inibição da função dos osteoclastos, com menor expressão da MMP-9.

De uma forma geral, o protocolo de TF proposto no nosso estudo parece não ter alcançado efeito anabólico desejado no osso, apesar de diversos estudos biomoleculares já demonstrarem os efeitos benéficos do exercício físico, quanto a disponibilidade e proliferação das MSC (MAREDZIAK et. al., 2015); regulação de fatores de osteogênicos (CHEN et. al., 2004); redução de marcadores de reabsorção óssea (GOMBOS et. al., 2016) e diminuição de citocinas inflamatórias (MARQUES et. al., 2013). Sugere-se que a falta de responsividade do TF nos animais velhos pode estar atrelada a idade dos mesmos ao iniciarem os exercícios, e também ao tipo de exercício, que pode não ter atingido um limiar mínimo de frequência e magnitude de tensão para promover osteogênese no osso sobremaneira à perda. O mesmo protocolo foi estudado em músculos e tendões neste modelo animal, e foi identificada melhora em ambos os tecidos, evitando o agravamento dos efeitos deletérios da idade. Os achados incluem diminuição de lipídios intramiocelulares; regulação de proteínas positivas à manutenção da estrutura do tendão; aumento de proteoglicanas, vasos sanguíneos e diminuição da calcificação no tendão; e prevenção da perda de função no tendão, com melhora das propriedades biomecânicas (RIBEIRO et. al., 2017; BARIN et. al., 2017; MARQUETI et. al., 2017a; MARQUETI et. al., 2017b).

O período de vida para se iniciar o treinamento e potencializar os efeitos benéficos no osso ainda não é bem definido. Estudos tem abordado esse tema em humanos. Rittweger et. al (2008), relatou em revisão que os efeitos do exercício físico parecem ser mais significativos para aumento de massa óssea em jovens no período pré-puberdade, e que o mesmo exercício perde muito de sua eficiência após o indivíduo alcançar a adolescência. A idade como fator de desgaste celular, influencia a mecanotransdução do osso a carga, por apresentar menor disponibilidade de osteócitos (MANOLAGAS & PARFITT, 2010) e redução do fluxo de fluido nos canalículos ósseos (SRINIVASAN et. al., 2012). E modelo animal, Turner et. al. (1995) aplicou cargas mecânicas graduais sobre tíbias de ratos, e observou que o limiar de resposta à carga em ratos velhos era superior a ratos jovens, e que o estímulo para a formação óssea não acontecia em cargas

inferiores ao limiar. Dito isso, acredita-se que o envelhecimento causa uma menor sensibilização da resposta à carga, representado no presente estudo pelos resultados da expressão gênica de COL-1 e MMPs no grupo VT.

Além disso, como citado acima, o tipo de exercício parece influenciar o remodelamento ósseo. O estímulo para formação óssea parece ser dependente do local, visto que estudos com modelos animais comprovaram a ocorrência de uma distribuição de massa óssea, de locais que sofrem menos carga para locais com maior estresse mecânico (ROBLING et al., 2002; HINEY et al., 2004), assim como em humanos (VLACHOPOULOS et. al, 2017). Além disso, fatores atuantes sobre o osso como a magnitude da tensão aplicada, a frequência da tensão (Hz), números de ciclos de carga, períodos de recuperação, e força de reação do solo, são influentes na adaptação do osso ao exercício físico (HART et. al., 2017; BRAVENBOER et. al., 2017). Srinivasan et. al. (2003), aplicaram protocolo de carga por meio de dispositivo mecânico, por 2 semanas, sobre a tíbia de camundongos com 21 meses de idade. O protocolo abordou dois modelos de carga separadamente (baixa ou alta magnitude, com ou sem repouso entre os ciclos). Observaram que a aplicação de carga com baixa-magnitude e 10 segundos de repouso entre os ciclos foi anabólico para o osso, diminuindo os efeitos deletérios do envelhecimento. Umemura et. al. (1995) compararam os efeitos dos treinamentos de salto e corrida para hipertrofia óssea de ratos jovens e velhos. Foi relatado que para ratos velhos, o treinamento de salto por 10 minutos produziu melhor efeito na massa óssea, em comparação ao treino em esteira por 60 minutos, no período de 8 semanas. Podemos inferir, então, que fatores como sexo, idade, tipo e duração do estímulo são fatores influenciadores para obtenção de resultados divergentes, apresentados na literatura.

Como limitações do estudo, podemos considerar que análises imunohisquímicas e histoquímicas do tecido auxiliariam o entendimento da integridade morfológica/estrutural e adaptação óssea, influenciada pelo envelhecimento.

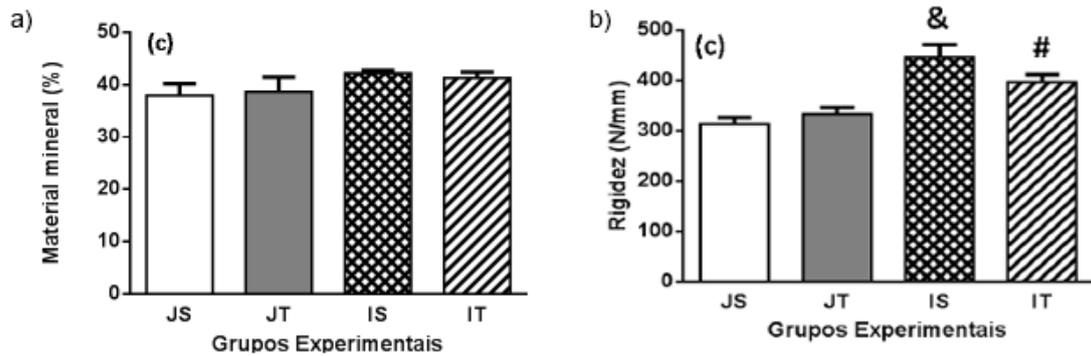
Conclusão

O TF protegeu o tecido ósseo ao inibir genes específicos importantes no processo de envelhecimento, evitando os efeitos deletérios na mineralização óssea. Contudo, o envelhecimento também alterou a expressão de genes responsáveis pelo conteúdo estrutural e remodelamento do osso, e nesse caso o TF não foi capaz prevenir os prejuízos acarretados pelo envelhecimento. É importante ressaltar que o envelhecimento e o tipo de exercício podem modular os resultados, assim protocolos de treinamento com duração de tempo maior podem trazer benefícios maiores ao osso.

Estudos futuros

Apesar da vasta gama de estudos explorando os potenciais benéficos do exercício, ainda não há consenso sobre qual protocolo de TF alcança resultados otimizados no osso. São necessários estudos que identifiquem protocolos de exercícios capazes de equalizar o *turnover* ósseo, sem favorecer somente uma das etapas do remodelamento, pois tanto a formação quanto a degradação óssea exacerbadas comprometem a funcionalidade estrutural do osso em absorver impactos. Outra sugestão seria mediar esse protocolo de TF por tempo maior, como estratégia de comparar os resultados obtidos no atual estudo.

Anexos



ANEXO I. Reprodução autorizada a partir da dissertação de Bogni (2013). Representação gráfica de parâmetros biofísicos (a) e biomecânicos do fêmur direito. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média, $p < 0,05$. & vs JS, JT e IT; # vs JS, JT e IS (ANOVA two-way e teste post hoc Tukey). JS, Jovem Sedentário (n=8); JT, Jovem Treinado (n=9); IS, Idoso Sedentário (n=8); IT, Idoso Treinado (n=9). Os grupos IS e IT representam os grupos VS e VT do nosso estudo, respectivamente. OBS: Para termos de comparação, lê-se “velho” no lugar do termo “idoso” usado pelo autor.

Referências Bibliográficas

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest.* 2004. 113:846–855.

Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Aug;65:20-31.

Almeida M, Ambrogini E, Han L, Manolagas SC, Jilka RL. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *J Biol Chem.* 2009 Oct 2;284(40):27438-48. doi: 10.1074/jbc.M109.023572.

Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2007 Sep 14;282(37):27298-305.

Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, Kousteni S, O'Brien CA, Bellido T, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem.* 2007b Sep 14;282(37):27285-97.

Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayaka AR, Zelenchuk L, Evdokiou A, Findlay DM. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *J Bone Miner Res.* 2011 Jul;26(7):1425-36.

Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013 Feb;19(2):179-92.

Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder J. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J. Anat.* 2006; 208:471–490.

Bogni, FH. Efeito do envelhecimento e do treinamento resistido sobre ossos de ratos. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

Bonet N, Ferrari SL. Exercise and the Skeleton: How It Works and What It Really Does. *IBMS BoneKEy.* 2010; 7(7):235-248.

Bornstein P. Cell-matrix interactions: the view from the outside. *Methods Cell Biol.* 2002; 69:7-11.

Boskey AL, Chiang P, Fermanis A, Brown J, Taleb H, David V, Rowe PS. MEPE's Diverse Effects on Mineralization. *Calcified tissue international*. 2009 Dec 9; 86(1): 42-46

Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep*. 2013 Dec 4;2:447.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42.

Brandi ML. Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Oct;48 Suppl 4:iv3-8.

Bravenboer N, van Rens BTTM, van Essen HW, van Dieën JH, Lips P. Ground reaction forces during walking with different load and slope combinations in rats. *J Exp Orthop*. 2017 Aug 31;4(1):28.

Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*. 2014 Oct 23;28:269-86.

Calmels P, Vico L, Alexandre C, Minaire P. Cross-sectional study of muscle strength and bone mineral density in a population of 106 women between the ages of 44 and 87 years: relationship with age and menopause. *Eur J Appl Physiol*. 1995; 70:180-186.

Cao J, Venton L, Sakata T, Halloran BP. Expression of RANKL and OPG Correlates With Age-Related Bone Loss in Male C57BL/6 Mice. *Journal Of Bone And Mineral Research*. 2003; 18(2):270-277.

Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:3-12.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41.

Chen Y, Wang S, Bu S, Wang Y, Duan Y, Yang S. Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR γ expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol*. 2011 Aug;111(8):1759-67.

Delaisse J, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K. Matrix Metalloproteinases (MMP) and Cathepsin K Contribute Differently to Osteoclastic Activities. *Microscopy Research And Technique*. 2003; 61:504–513.

Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. COBEA, Brasília. 2013.

Endo-Munoz L, Evdokiou A, Saunders NA. The role of osteoclasts and tumour-associated macrophages in osteosarcoma metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1826. 2012; 434–442.

Feng X, MacDonal JM. Disorders of Bone Remodeling *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2011. 6:121–45.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Mar 1;11(2):E151-7.

Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJ, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med.* 2014 Jan;44(1):37-53.

Gibon E, Lu L, Goodman SB. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Mar 22;7:44. doi: 10.1186/s13287-016-0300-9.

Gombos GC, Bajsz V, Pék E, Schmidt B, Sió E, Molics B, Betlehem J. Direct effects of physical training on markers of bone metabolism and serum sclerostin concentrations in older adults with low bone mass. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016 Jun 8;17:254

Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, McNeish JD, Brown TA. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):1998-2007.

Grabowski P. Physiology of Bone. *Endocr Dev.* 2015;28:33-55.

Hart NH, Nimphius S, Rantalainen T, Ireland A, Siafarikas A, Newton RU. Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2017 Sep 1;17(3):114-139.

Henderson NK, White CP, Eisman JA. The roles of exercise and fall risk reduction in the prevention of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Jun;27(2):369-87.

Hill PA, Murphy G, Docherty A, Hembry R. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *Journal of Cell Science.* 1994; 107: 3055-3064.

Hiney KM, Nielsen BD, Rosenstein D, Orth MW, Marks BP. High-intensity exercise of short duration alters bovine bone density and shape. *J Anim Sci.* 2004 Jun;82(6):1612-20.

Holguin N, Brodt MD, Silva MJ. Activation of Wnt Signaling by Mechanical Loading Is Impaired in the Bone of Old Mice. *J Bone Miner Res.* 2016 December ; 31(12): 2215–2226.

Hornberger TA Jr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 2004 Feb;29(1):16-31.

Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, Harbour RT, Caldwell LM, Creed G. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Jul 6;(7):CD000333.

Hughes JM, Popp KL, Yanovich R, Bouxsein ML, Matheny RW Jr. The role of adaptive bone formation in the etiology of stress fracture. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017 May;242(9):897-906.

Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, Itoh T, Inada M, Noguchi T, Park JS, Onodera T, Krane SM, Noda M, Itohara S. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. *J Biol Chem*. 2006 Nov 3;281(44):33814-24.

Jilka RL, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Roberson PK, Weinstein RS, Manolagas SC. Decreased oxidative stress and greater bone anabolism in the aged, when compared to the young, murine skeleton with parathyroid hormone administration. *Aging Cell*. 2010 Oct;9(5):851-67.

Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci*. 2007 Jun 15;120(Pt 12):1955-8.

Kesavan C, Mohan S, Oberholtzer S, Wergedal JE, Baylink DJ. Mechanical loading-induced gene expression and BMD changes are different in two inbred mouse strains. *J Appl Physiol (1985)*. 2005 Nov;99(5):1951-7.

Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res*. 2013 May;352(2):191-8.

Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol*. 2010;658:43-9.

Kulkarni RN, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J. Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocytes: involvement of MEPE. *Calcif Tissue Int*. 2010 Nov;87(5):461-8.

Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics (online)*. 2007; 8:70.

Lacerda DR, Serakides R, de Melo Ocarino N, Ferreira AV, Moraes MM, Boeloni JN, Silva JF, de Oliveira MC, de Barcellos LA, Rodrigues LO, Soares DD. Osteopetrosis in obese female rats is site-specifically inhibited by physical training. *Exp Physiol*. 2015 Jan;100(1):44-56.

Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Boone T, Geng Z, Niu QT, Ke HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2009 Apr;24(4):578-88.

Liang HP, Xu J, Xue M, Jackson CJ. Matrix metalloproteinases in bone development and pathology: current knowledge and potential clinical utility. *Metalloproteinases In Medicine* 2016;3 93–102.

Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li Y, Feng G, Gao X, He L. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res.* 2009 Oct;24(10):1651-61.

Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Dec 22;13(1):27-38.

Macias BR, Swift JM, Nilsson MI, Hogan HA, Bouse SD, Bloomfield SA. Simulated resistance training, but not alendronate, increases cortical bone formation and suppresses sclerostin during disuse. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Mar;112(5):918-25.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46-62.

Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Jun;21(6):369-74.

Marcus R. Relationship of Age-Related Decreases in Muscle Mass and Strength to Skeletal Status. *The Journals of Gerontology, Series A.* 1995; 50:86-87.

Maređziak M, Śmieszek A, Chrzęstek K, Basinska K, Marycz K. Physical Activity Increases the Total Number of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, Enhances Their Osteogenic Potential, and Inhibits Their Adipogenic Properties. *Stem Cells Int.* 2015;2015:379093.

Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF, Selistre-de-Araujo HS. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol.* 2008 Dec;104(6):1087-93.

Mauney JR, Sjostrom S, Blumberg J, Horan R, O'Leary JP, Vunjak-Novakovic G, Volloch V, Kaplan DL. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2004 May;74(5):458-68.

McCalden RW, McGeough JA, Barker MB, Court-Brown CM. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am.* 1993 Aug;75(8):1193-205.

Meunier PJ, Boivin G. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. *Bone.* 1997 Nov;21(5):373-7.

Murphy G, Lee MH. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? *Ann Rheum Dis.* 2005; 64:44–iv47.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.

Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LB, Freitas AC. A participação das metaloproteínases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2006; 35(4): 233-38.

Ocarino NM, Marubayashi U, Cardoso TG, Guimaraes CV, Silva AE, Torres RC, Serakides R. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007 Jan-Mar;7(1):84-93.

Paiva KB, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2014; 561:74–87

Panwar P, Butler GS, Jamroz A, Azizi P, Overall CM, Brömme D. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases. *Matrix Biol.* 2017 Jun 17. pii: S0945-053X(17)30130-0.

Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 2005 Nov;19(13):1842-4.

Quarto R, Thomas D, Liang CT. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int.* 1995; 56(2): 123-129.

Rittweger J. Ten years muscle-bone hypothesis: What have we learned so far?. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008; 8(2):174-178.

Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455-98.

Robling AG, Hinant FM, Burr DB, Turner CH. Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. *J Bone Miner Res*. 2002 Aug;17(8):1545-54.

Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5866-75.

Ross FP. *Osteoclast Biology and Bone Resorption. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, John Wiley & Sons, Inc. 2013: 25-33.

Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2010; 21:195–214.

Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2012 Jun;10(2):118-25.

Shahnazari M, Wronski T, Chu V, Williams A, Leeper A, Stolina M, Ke HZ, Halloran B. Early response of bone marrow osteoprogenitors to skeletal unloading and sclerostin antibody. *Calcif Tissue Int*. 2012 Jul;91(1):50-8.

Shiguemoto GE, Prestes J, Leite RD, Pereira GB, Pontes CL, D'Ávila FV, Botero JP, Baldissera V, Nonaka KO, Selistre-de-Araújo HS, Perez SE. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. *Scand J Med Sci Sports*. 2012 Oct;22(5):607-17.

Smith JK, Dykes R, Chi DS. The Effect of Long-Term Exercise on the Production of Osteoclastogenic and Antiosteoclastogenic Cytokines by Peripheral Blood Mononuclear Cells and on Serum Markers of Bone Metabolism. *J Osteoporos*. 2016;2016:5925380.

Srinivasan S, Ausk BJ, Prasad J, Threet D, Bain SD, Richardson TS, Gross TS. Rescuing Loading Induced Bone Formation at Senescence. *PLoS Computational Biology*. 2010 Sep 9; 6(9): e1000924

Srinivasan S, Gross TS, Bain SD. Bone mechanotransduction may require augmentation in order to strengthen the senescent skeleton. *Ageing Res Rev*. 2012 Jul;11(3):353-60.

Stolzing A, Scutt A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell*. 2006 Jun;5(3):213-24.

Stringhetta-Garcia CT, Singulani MP, Santos LF, Louzada MJ, Nakamune AC, Chaves-Neto AH, Rossi AC, Ervolino E, Dornelles RC. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. *Bone*. 2016 Apr;85:45-54.

Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev*. 2005 Dec;208:181-93.

Tezval M, Biblis M, Sehmisch S, Schmelz U, Kolios L, Rack T, Stuermer KM, Stuermer EK. Improvement of femoral bone quality after low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the ovariectomized rat as an osteopenia model. *Calcif Tissue Int*. 2011 Jan;88(1):33-40.

Thompson JB, Kindt JH, Drake B, Hansma HG, Morse DE, Hansma PK. Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):773-6.

Trouvin AP, Goëb V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*. 2010 Nov 19;5:345-54. doi: 10.2147/CIA.S10153. Review. PubMed [citation] PMID: 21228900, PMCID: PMC3010170

Turner CH, Takano Y, Owan I. Aging changes mechanical loading thresholds for bone formation in rats. *J Bone Miner Res*. 1995 Oct;10(10):1544-9.

Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*. 2000; 113: 377-381.

Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013 May-Jun;48(3):222-72.

Verschueren S, Gielen E, O'Neill TW, Pye SR, Adams JE, Ward KA, Wu FC, Szulc P, Laurent M, Claessens F, Vanderschueren D, Boonen S. Sarcopenia and its relationship with bone mineral density in middle-aged and elderly European men. *Osteoporos Int*. 2013 Jan;24(1):87-98.

Vicente WS, dos Reis LM, Graciolli RG, Graciolli FG, Dominguez WV, et al. (2013) Bone Plasticity in Response to Exercise Is Sex-Dependent in Rats. *PLoS ONE* 8(5):e64725.

Vlachopoulos D, Barker AR, Ubago-Guisado E, Fatouros IG, Knapp KM, Williams CA, Gracia-Marco L. Longitudinal Adaptations of Bone Mass, Geometry, and Metabolism in Adolescent Male Athletes: The PRO-BONE Study. *J Bone Miner Res*. 2017 Nov;32(11):2269-2277.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Development*. 2000; 14:2123–2133.

Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med*. 2009 Oct;15(10):468-77.

Whiteford J, Ackland TR, Dhaliwal SS, James AP, Woodhouse JJ, Price R, Prince RL, Kerr DA, Whiterford. Effects of a 1-year randomized controlled trial of resistance training on lower limb bone and muscle structure and function in older men. *Osteoporos Int*. 2010 Sep;21(9):1529-36.

Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*. 2003 Dec 1;22(23):6267-76.

Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, Crane J, Frassica F, Zhang L, Rodriguez JP, Xiaofeng Jia, Shoshana Yakar, Shouhong Xuan, Argiris Efstratiadis, Mei Wan, Xu Cao. Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2012 Jul;18(7):1095-101. doi: 10.1038/nm.2793.

Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2003;14 Suppl 3:S35-42.

Zelenchuk LV, Hedge AM, Rowe PS. Age dependent regulation of bone-mass and renal function by the MEPE ASARM-motif. *Bone*. 2015 Oct;79:131-42.

Zhang L, Liu M, Zhou X, Liu Y, Jing B, Wang X, Zhang Q, Sun Y. Role of Osteoprotegerin (OPG) in Bone Marrow Adipogenesis. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40(3-4):681-692.

Nampei A, Hashimoto J, Hayashida K, Tsuboi H, Shi K, Tsuji I, Miyashita H, Yamada T, Matsukawa N, Matsumoto M, Morimoto S, Ogihara T, Ochi T, Yoshikawa H.. Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J Bone Miner Metab* (2004) 22:176–184

Gooi JH, Chia LY, Walsh NC, Karsdal MA, Quinn JM, Martin TJ, Sims NA. Decline in calcitonin receptor expression in osteocytes with age. *J Endocrinol*. 2014 Apr 22;221(2):181-91.

El Khassawna T, Böcker W, Brodsky K, Weisweiler D, Govindarajan P, Kampschulte M, Thormann U, Henss A, Rohnke M, Bauer N, Müller R, Deutsch A, Ignatius A, Dürselen L, Langheinrich A, Lips KS, Schnettler R, Heiss C. Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats. *Histochem Cell Biol*. 2015 Nov;144(5):491-507.

Barin FR, Durigan JLQ, Oliveira KS, Migliolo L, Almeida JA, Carvalho M, Petriz B, Selistre-de-Araujo HS, Fontes W, Franco OL, Marqueti RC. Beneficial effects of resistance training on the protein profile of the calcaneal tendon during aging. *Exp Gerontol*. 2017 Oct 21;100:54-62.

Ribeiro MBT, Guzzoni V, Hord JM, et al. Resistance training regulates gene expression of molecules associated with intramyocellular lipids, glucose signaling and fiber size in old rats. *Scientific Reports*. 2017;7:8593. doi:10.1038/s41598-017-09343-6.

Marqueti RC, Durigan JLQ, Oliveira AJS, Mekaro MS, Guzzoni V, Aro AA, Pimentel ER, Selistre-de-Araujo HS. Effects of aging and resistance training in rat tendon remodeling. *FASEB J*. 2017a Sep 12. pii: fj.201700543R.

Marqueti RC, Almeida JA, Nakagaki WR, Guzzoni V, Boghi F, Renner A, Silva PE, Durigan JL, Selistre-de-Araújo HS. Resistance training minimizes the biomechanical effects of aging in three different rat tendons. *J Biomech*. 2017b Feb 28;53:29-35.

Srinivasan S, Agans SC, King KA, Moy NY, Poliachik SL, Gross TS. Enabling bone formation in the aged skeleton via rest-inserted mechanical loading. *Bone*. 2003 Dec;33(6):946-55.

Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*. 2006;17(3):319-36.